

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 11-310602

(43)Date of publication of application : 09.11.1999

(51)Int.Cl.

C08B 37/00
A61K 31/00
A61K 31/00
A61K 31/725
C08B 37/10

(21)Application number : 11-049335

(71)Applicant : SEIKAGAKU KOGYO CO LTD

(22)Date of filing : 26.02.1999

(72)Inventor : USUKI YASUTAKE
KARIYA YUTAKA

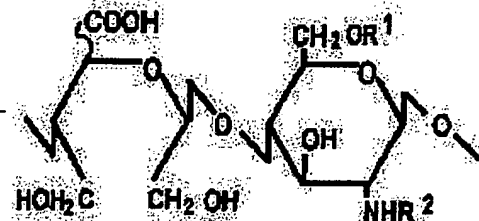
(30)Priority

Priority number : 10 60336 Priority date : 26.02.1998 Priority country : JP

(54) NEW POLYSACCHARIDE DERIVATIVE, PRODUCTION THEREOF, AND MEDICINAL COMPOSITION CONTAINING THE SAME AS ACTIVE INGREDIENT**(57)Abstract:**

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a glycosaminoglycan derivative having a low anti-blood coagulation activity, and a neuraxon extension enhancing activity and a sialidase inhibition activity by having a recurring structure of hexosamine and hexuronic acid as a base skeleton, and partially specific structure.

SOLUTION: This objective new polysaccharide derivative having (A) a composition consisting of 0-10 mol.% 2-deoxy-2-sulfamino-4-O-(4-deoxy-2-O-sulfo- α -L-threo-hex-4-enopyranosyluronic acid)-6-O-sulfo-D-glucose, 95-70 mol.% 2-deoxy-2-sulfamino-4-O-(4-deoxy- α -L-threo-hex-4-enopyranosyluronic acid)-6-O-sulfo-D-glucose and 5-20 mol.% 2-deoxy-2-sulfoamino-4-O-(4-deoxy- α -L-threo-hex-4-enopyranosyluronic acid)-D-glucose, (B) ≤ 50 sec activated partial thromboplastin time measured by adding 3 μ g/ml thereof into a standard plasma as a final concentration, (C) 9,000-13,000 Da weight-averaged molecular weight and (D) ≥ 1 structure of the formula (R1 is H or SO₃H; R2 is COCH₃ or SO₃H) per 1 molecule base skeleton, is obtained.

**LEGAL STATUS**

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

BEST AVAILABLE COPY

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-310602

(43) 公開日 平成11年(1999)11月9日

(51) Int. Cl. ⁶	識別記号	F I	
C08B 37/00		C08B 37/00	G
			H
A61K 31/00	603	A61K 31/00	603
	625		625
31/725		31/725	
審査請求 未請求 請求項の数20 O L (全15頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号	特願平11-49335	(71) 出願人	000195524 生化学工業株式会社 東京都中央区日本橋本町2丁目1番5号
(22) 出願日	平成11年(1999)2月26日	(72) 発明者	臼杵 靖剛 東京都東村山市栄町2-4-23 グラント ルーム2番館801
(31) 優先権主張番号	特願平10-60336	(72) 発明者	荻谷 豊 神奈川県横浜市港北区綱島西2-3-2 ナイスアーバンスティッツ綱島609号
(32) 優先日	平10(1998)2月26日	(74) 代理人	弁理士 長谷川 一 (外1名)
(33) 優先権主張国	日本 (J P)		

(54) 【発明の名称】 新規多糖誘導体、その製造法及びそれを有効成分とする医薬組成物

(57) 【要約】

【課題】 抗血液凝固活性が低く、神経突起伸長促進活性及びシアリダーゼ阻害活性を有するグリコサミノグリカン誘導体、その製造法およびそれを有効成分とする医薬組成物を提供する。

【解決手段】 ヘキシサミンとヘキスロン酸の二糖の繰り返し構造を基本骨格として有し、部分的にその構成単糖であるヘキスロン酸の2位と3位の炭素原子間が開裂しており、更に開裂していないヘキスロン酸の2位の水酸基の一部又は全部が硫酸基で置換されていない新規グリコサミノグリカン誘導体及びその塩、グリコサミノグリカンの2位に硫酸基を有しないヘキスロン酸の2-3位間の炭素原子結合の開裂処理及びヘキスロン酸の2位-硫酸基の選択的な脱硫酸化処理からなる該グリコサミノグリカン誘導体の製造法並びに該グリコサミノグリカン誘導体を有効成分とする医薬組成物である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の(a)、(b)及び(c)の性質を有し、且つ(d)に記載の一般式(1)で表される構造を、ヘキシサミンとヘキシロン酸の繰り返し単位構造で形成される基本骨格1分子あたりに1以上有することを特徴とするグリコサミノグリカン誘導体又はその塩。

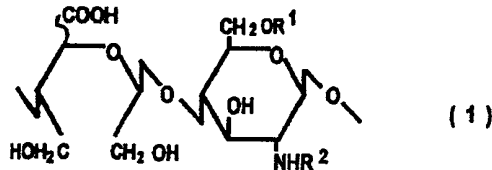
(a) グリコサミノグリカン分解酵素による分解と高速液体クロマトグラフィーによる分析を組み合わせた二糖分析により得られる二糖体組成において2-デオキシ-2-スルファミノ-4-O-(4-デオキシ-2-O-スルホ- α -L-threo-hex-4-エノピラノシルウロン酸)-6-O-スルホ-D-グルコースのモル%が50~10%、2-デオキシ-2-スルファミノ-4-O-(4-デオキシ- α -L-threo-hex-4-エノピラノシルウロン酸)-6-O-スルホ-D-グルコースのモル%が95~70%であり、2-デオキシ-2-スルファミノ-4-O-(4-デオキシ- α -L-threo-hex-4-エノピラノシルウロン酸)-D-グルコースのモル%が5~20%であること。

(b) 標準血漿に最終濃度3 μ g/mlで添加して測定した際の活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)が50秒以下であること。

(c) 重量平均分子量が9,000~13,000 Da (ダルトン)であること。

(d) 一般式(1)

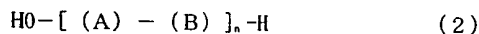
【化1】



(但し、R¹はH又はSO₃Hであり、R²はCOCH₃又はSO₃Hを示す。)

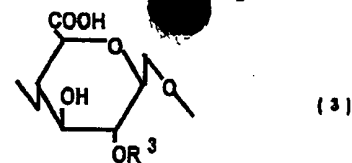
【請求項2】 下記一般式(2)の構造を有するグリコサミノグリカン誘導体であって、標準血漿に最終濃度3 μ g/mlで添加して測定した際の活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)が50秒以下であることを特徴とするグリコサミノグリカン誘導体又はその塩。

【化2】

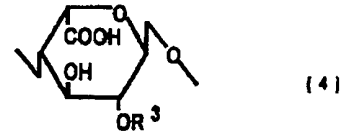


ただし、(A)は下記一般式(3)で示されるグルクロン酸残基、下記一般式(4)で示されるイズロン酸残基又は下記一般式(5)で示される開裂されたヘキシロン酸残基のいずれかであり、

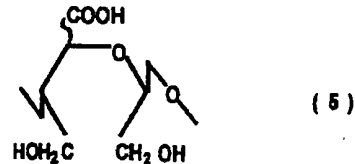
【化3】



(3)



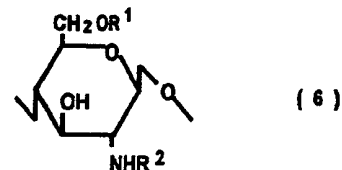
(4)



(5)

(B)は下記一般式(6)で示されるヘキシサミン残基をそれぞれ示す。

【化4】



(6)

ただし、一般式(3)~(6)においてR¹及びR²はそれぞれ独立にH又はSO₃Hであり、R²はCOCH₃又はSO₃Hを示す。また、一般式(2)において、nは15≤n≤40を充たす整数であり、(A)の少なくとも一つは一般式(5)の残基である。

【請求項3】 下記の工程①及び②を含む方法により得られ、少なくとも前記一般式(5)で示される開裂されたヘキシロン酸残基を有するグリコサミノグリカン誘導体又はその塩。

① ヘキシサミンとヘキシロン酸の繰り返し単位構造を基本骨格とする硫酸化グリコサミノグリカンを開裂処理して、その骨格中に存在する2位に硫酸基を有しないヘキシロン酸の少なくとも一部の2位と3位の炭素原子間のみを開裂する工程、

② ヘキシロン酸の2位の硫酸基を特異的に除去しうる脱硫酸化手段により工程①の生成物を脱硫酸化処理し、2位に硫酸基を有する全ヘキシロン酸の90%以上の当該硫酸基を脱硫酸化する工程。

【請求項4】 ヘキシサミンとヘキシロン酸の繰り返し単位構造を基本骨格とする硫酸化グリコサミノグリカンがヘパリンであることを特徴とする請求項3記載のグリコサミノグリカン誘導体又はその塩。

【請求項5】 工程①の開裂処理が、過ヨウ素酸塩を使用する酸化的開裂反応を含むことを特徴とする請求項3又は4記載のグリコサミノグリカン誘導体又はその塩。

【請求項6】 工程①において、更に酸化的開裂反応生成物を還元することを特徴とする請求項5記載のグリコサミノグリカン誘導体又はその塩。

【請求項7】 請求項3の工程②におけるヘキサロン酸の2位の硫酸基の脱硫酸化手段が、アルカリ金属水酸化物又はアルカリ土類金属水酸化物を使用する加水分解反応であることを特徴とする請求項3～6のいずれか一項記載のグリコサミノグリカン誘導体又はその塩。

【請求項8】 培地中の最終濃度 $1\mu\text{g/ml}$ ～ $10\mu\text{g/ml}$ のグリコサミノグリカン誘導体をWistar系ラット大脳皮質の初代培養細胞に接触させた際の該細胞の神経突起伸張活性が、同濃度範囲内の標準ヘパリンと比して1.5倍以上であることを特徴とする請求項1～7のいずれか一項記載のグリコサミノグリカン誘導体又はその塩。

【請求項9】 請求項1～8のいずれか一項に記載のグリコサミノグリカン誘導体又はその薬理学的に許容し得る塩を有効成分として含有することを特徴とする医薬組成物。

【請求項10】 医薬組成物が神経疾患治療剤であることを特徴とする請求項9記載の医薬組成物。

【請求項11】 神経疾患治療剤が中枢神経疾患治療剤であることを特徴とする請求項10記載の医薬組成物。

【請求項12】 神経疾患治療剤が末梢神経疾患治療剤であることを特徴とする請求項10記載の医薬組成物。

【請求項13】 請求項1～8のいずれか一項に記載のグリコサミノグリカン誘導体又はその薬理学的に許容し得る塩を有効成分として含有することを特徴とするシアリダーゼ阻害剤。

【請求項14】 インフルエンザウイルスのシアリダーゼを阻害する阻害剤であることを特徴とする請求項13記載のシアリダーゼ阻害剤。

【請求項15】 インフルエンザ治療剤であることを特徴とする請求項13又は14記載のシアリダーゼ阻害剤。

【請求項16】 下記の工程①及び②を含む、ヘキソサミンとヘキサロン酸の繰り返し単位構造を基本骨格とし、該ヘキサロン酸はその一部が2位と3位の炭素原子間で開裂されているグリコサミノグリカン誘導体の製造法。

① ヘキソサミンとヘキサロン酸の繰り返し単位構造を基本骨格とする硫酸化グリコサミノグリカンを開裂処理して、その骨格中に存在する2位に硫酸基を有しないヘキサロン酸の少なくともその一部を2位と3位の炭素原子間において選択的に開裂する工程、

② ヘキサロン酸の2位の硫酸基を特異的に除去しうる脱硫酸化手段により工程①の生成物を脱硫酸化処理して、2位に硫酸基を有する全ヘキサロン酸の90%以上の当該硫酸基を脱硫酸化する工程。

【請求項17】 ヘキソサミンとヘキサロン酸の繰り返し単位構造を基本骨格とする硫酸化グリコサミノグリカ

ンがヘパリンであることを特徴とする請求項16記載のグリコサミノグリカン誘導体の製造法。

【請求項18】 工程①の開裂処理が、過ヨウ素酸塩を使用する酸化的開裂反応を含むことを特徴とする請求項16又は17記載のグリコサミノグリカン誘導体の製造法。

【請求項19】 工程①において、更に酸化的開裂反応生成物を還元することを特徴とする請求項18記載のグリコサミノグリカン誘導体の製造法。

【請求項20】 工程②の脱硫酸化手段が、アルカリ金属水酸化物又はアルカリ土類金属水酸化物を使用する加水分解反応であることを特徴とする請求項16～19のいずれか一項記載のグリコサミノグリカン誘導体の製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、神経突起伸張活性及びシアリダーゼ阻害活性を有する新規グリコサミノグリカン誘導体又はその塩、その製造法並びに当該グリコサミノグリカン誘導体又はその塩を有効成分とする医薬組成物に関する。

【0002】

【従来の技術】神経疾患は、神経細胞の成長が抑制されること、神経細胞が虚血による糖の供給量低下又は細胞内のエネルギー代謝阻害によって維持されなくなり壊死を起こすこと、又は神経伝達物質が分解され、神経伝達が阻害されることに起因する。故にこの疾患の治療としては、神経細胞の成長を維持すること、神経細胞の虚血を防ぐこと、又は神経細胞内のエネルギー代謝を維持することを目的としてなされてきた。即ち、神経細胞の成長活性を有する物質である神経栄養因子（神経成長因子：NGF、脳由来神経栄養因子：BDNF、毛様体神経栄養因子：CNTF、線維芽細胞増殖因子：FGFなど）を外から投与すること又は神経栄養因子の合成を促進すること、アルドース還元酵素阻害剤を適用することによりアルドース還元酵素の活性によって生じるソルビトールの過剰生成による神経細胞の虚血及び神経細胞内でのエネルギー代謝の低下を防止すること、及びアセチルコリンエステラーゼ阻害剤を投与することによりアセチルコリンの分解を防止して神経細胞の伝達を維持することが神経疾患に対する根本的方策とされている。しかし、投与する物質の純度に起因する抗原性、酵素活性を阻害することによる副作用及び投与する物質そのものが有する毒性などが問題点となっている。

【0003】ところで、グリコサミノグリカンには神経突起伸張を促進する活性があることが知られている（J. Cell Physiol., 135, 293-300(1988)）。またヘパリン並びにその誘導体である過ヨウ素酸化還元ヘパリン及び過硫酸化ヘパリンは神経突起伸長活性を持つことが知られており、外傷性、虚血性及び毒性末梢神経障害の治療

に有効であることが知られている(特開平6-157322)が、医薬品として利用する上で上記疾患を抑制するのに十分な活性を有する物質は未だ得られていない。

【0004】一方、現在抗ウイルス剤、特にインフルエンザ治療剤としては、例えばGS4104 (W096/26933) やザナミビル (zanamivir: 4-guanidino-Neu4Ac2en: 特表平5-507068) 等のシアリダーゼ(ノイラミニダーゼ)阻害剤が有効であることが一般に知られている。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】ヘパリン及びその誘導体は生体物質であるため抗原性が低いが、抗血液凝固活性が高いため医薬品として使用する際の用途及び濃度が大幅に限定されていた。一般にヘパリンを体内へ投与する場合は、その抗血液凝固活性の高さによる出血活性が重大な問題点となっている。そこで、抗血液凝固活性が低く、更に神経障害改善効果が増強された新たな物質が期待されている。

【0006】

【課題を解決するための手段】上記課題の解決に鑑み、本発明者らは、血液に対する抗凝固活性が低く、優れた神経障害改善効果を持つ物質を得ることを目的として鋭意検討した結果、特定の構造を有するグリコサミノグリカン誘導体が高い神経突起伸長活性、すなわち神経障害改善活性を有することを見出し、当該物質は抗血液凝固活性がヘパリンに比して大幅に低下していることを確認することにより本発明を完成した。すなわち、ヘキソサミンとヘキスロン酸の二糖の繰り返し単位構造を基本骨格として有し、部分的にその構成単糖であるヘキスロン酸の2位と3位の炭素原子間が開裂しており、更に開裂していないヘキスロン酸の少なくとも一部がその2位に硫酸基を有しない、新規なグリコサミノグリカン誘導体が、抗血液凝固活性が低く、しかも優れた神経突起伸長活性を有することを見出し、当該性質を利用することにより神経障害の改善に優れた効果を有する医薬組成物を提供することを可能とした。また、更に本発明者らは、細胞死及び神経突起の退縮に際し、シアリダーゼ活性が上がり、細胞膜上で神経栄養因子活性の維持、促進に関わることが知られているガングリオンドが減少することに基づき探索を進めた結果、上記新規なグリコサミノグリカン誘導体が、驚くべきことに強いシアリダーゼ阻害活性を有することを見出し、上記グリコサミノグリカン誘導体の当該阻害活性を利用したシアリダーゼ阻害剤を提供することを可能とした。

【0007】本発明の第1の要旨は、以下の(a)、(b)及び(c)の性質を有し、且つ(d)に記載の一般式(1)で表される構造を、ヘキソサミンとヘキスロン酸の繰り返し単位構造で形成される基本骨格1分子あたりに1以上有する新規グリコサミノグリカン誘導体又はその塩である。

(a) グリコサミノグリカン分解酵素による分解と高速

液体クロマトグラフィーによる分析を組み合わせた二糖分析により得られる二糖体組成において、2-デオキシ-2-スルファミノ-4-O-(4-デオキシ-2-O-スルホ- α -L-threo-hex-4-エノピラノシルウロン酸)-6-O-スルホ-D-グルコース(以下 Δ DiHS-tri(U, 6, N)Sとも記載する)のモル%が0~10%、2-デオキシ-2-スルファミノ-4-O-(4-デオキシ- α -L-threo-hex-4-エノピラノシルウロン酸)-6-O-スルホ-D-グルコース(以下 Δ DiHS-di(6, N)Sとも記載する)のモル%が95~70%であり、2-デオキシ-2-スルファミノ-4-O-(4-デオキシ- α -L-threo-hex-4-エノピラノシルウロン酸)-D-グルコース(以下 Δ DiHS-NSとも記載する)のモル%が5~20%であること。

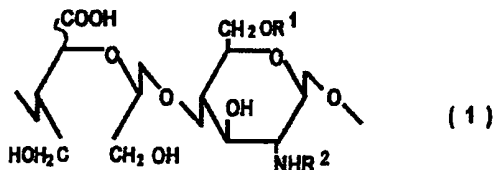
(b) 標準血漿に最終濃度3 μ g/mlで添加して測定した際の活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)が50秒以下であること。

(c) 重量平均分子量が9,000~13,000 Da(ダルトン)であること。

(d) 一般式(1)

【0008】

【化5】



【0009】(但し、 R^1 はH又は SO_3H であり、 R^2 は $COCH_3$ 又は SO_3H を示す。)

【0010】本発明の第2の要旨は、下記工程①及び②を含む、上記(a)、(b)及び(c)の性質を有し、且つ(d)に規定する特定構造を有する新規グリコサミノグリカン誘導体の製造方法であり、第3の要旨は、該グリコサミノグリカン誘導体を有効成分とする医薬組成物及びシアリダーゼ阻害剤である。

① ヘキソサミンとヘキスロン酸の繰り返し単位構造を基本骨格とする硫酸化グリコサミノグリカンを開裂処理して、その骨格中に存在する2位に硫酸基を有しないヘキスロン酸の少なくとも一部の2位と3位の炭素原子間のみを開裂する工程、

② ヘキスロン酸の2位の硫酸基を特異的に除去しうる脱硫酸化手段により工程①の生成物を脱硫酸化処理して、2位に硫酸基を有する全ヘキスロン酸の90%以上の当該硫酸基を脱硫酸化する工程。

【0011】

【発明の実施の形態】以下に本発明を更に詳説する。

本発明物質

本発明物質は上述の如く、(a)、(b)及び(c)の性質を有し、且つ(d)に規定する特定構造を有する新規グリコサミノグリカン誘導体である。

【0012】本明細書中における「ヘキソサミン」と

は、ヘキソース（単糖）の2位炭素原子にアミノ基、アセチルアミノ基又はスルホアミノ基を有し、6位ヒドロキシル基が硫酸化されていることもある単糖を指称し、「ヘキスロン酸」とは、ヘキソースの6位炭素原子がカルボキシル基を形成し、2位ヒドロキシル基が硫酸化されていることもある単糖を指称し、「グリコサミノグリカン」とは、上記ヘキソサミンとヘキスロン酸の繰り返し単位で形成される構造を基本骨格とする多糖を指称し、「硫酸化グリコサミノグリカン」とは、特に上記グリコサミノグリカンのうち、硫酸基を有するヘキソサミン又はヘキスロン酸を構成単糖として1以上有するグリコサミノグリカンであって、2位に硫酸基を有しないヘキスロン酸を少なくとも1以上構成単糖として有している多糖を指称する。

【0013】なお、本発明における上記（a）のグリコサミノグリカン誘導体の二糖体組成は、後述する実施例の試験法1に記載の二糖分析法による測定値から算出したものであり、また（c）の重量平均分子量は実施例の試験法2に記載の分子量測定法による測定値である。更に（b）のAPTTは実施例の試験法4に記載のAPTT測定法による測定値である。

【0014】（a）に規定する二糖体組成は、試験法1に記載の酵素消化と高速液体クロマトグラフィーを組み合わせた二糖分析により特定が可能な下記一般式（7）で示される不飽和二糖の総量 [2-アセトアミド-2-デオキシ-4-O-(4-デオキシ- α -L-threo-hex-エノピラノシルウロン酸)-D-グルコース（以下 Δ DiHS-OSと記載する）、2-アセトアミド-2-デオキシ-4-O-(4-デオキシ- α -L-threo-hex-4-エノピラノシルウロン酸)-6-O-スルホ-D-グルコース（以下 Δ DiHS-6Sと記載する）、2-デオキ

不飽和二糖

	R ¹
Δ DiHS-OS	H
Δ DiHS-6S	SO ₃ H
Δ DiHS-NS	H
Δ DiHS-US	H
Δ DiHS-di(6,N)S	SO ₃ H
Δ DiHS-di(U,N)S	H
Δ DiHS-di(U,6)S	SO ₃ H
Δ DiHS-tri(U,6,N)S	SO ₃ H

【0017】また、上記略号の示す構造は以下の通り表記されることもある。

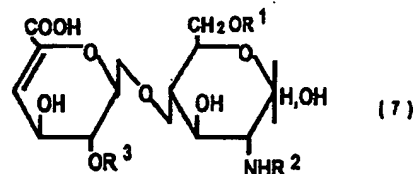
Δ DiHS-OS: Δ HexA1 \rightarrow 4GlcNAc、 Δ DiHS-6S: Δ HexA1 \rightarrow 4GlcNAc(6S)、 Δ DiHS-NS: Δ HexA1 \rightarrow 4GlcNS、 Δ DiHS-US: Δ HexA(2S)1 \rightarrow 4GlcNAc、 Δ DiHS-di(6,N)S: Δ HexA1 \rightarrow 4GlcNS(6S)、 Δ DiHS-di(U,N)S: Δ HexA(2S)1 \rightarrow 4GlcNS、 Δ DiHS-di(U,6)S: Δ HexA(2S)1 \rightarrow 4GlcNAc(6S)、 Δ DiHS-tri(U,6,N)S: Δ HexA(2S)1 \rightarrow 4GlcNS(6S)。

上記式中、 Δ HexAは不飽和ヘキスロン酸、GlcNAcはN-アセチルグルコサミン、GlcNSはN-硫酸化グルコサミン、

シ-2-スルファミノ-4-O-(4-デオキシ- α -L-threo-hex-4-エノピラノシルウロン酸)-D-グルコース (Δ DiHS-N S)、2-アセトアミド-2-デオキシ-4-O-(4-デオキシ-2-O-スルホ- α -L-threo-hex-4-エノピラノシルウロン酸)-D-グルコース（以下 Δ DiHS-USと記載する）、2-デオキシ-2-スルファミノ-4-O-(4-デオキシ- α -L-threo-hex-4-エノピラノシルウロン酸)-6-O-スルホ-D-グルコース (Δ DiHS-di(6,N)S)、2-デオキシ-2-スルファミノ-4-O-(4-デオキシ-2-O-スルホ- α -L-threo-hex-4-エノピラノシルウロン酸)-D-グルコース（以下 Δ DiHS-di(U,N)Sと記載する）、2-アセトアミド-2-デオキシ-4-O-(4-デオキシ-2-O-スルホ- α -L-threo-hex-4-エノピラノシルウロン酸)-6-O-スルホ-D-グルコース（以下 Δ DiHS-di(U,6)Sと記載する）、2-デオキシ-2-スルファミノ-4-O-(4-デオキシ-2-O-スルホ- α -L-threo-hex-4-エノピラノシルウロン酸)-6-O-スルホ-D-グルコース (Δ DiHS-tri(U,6,N)S) のモル%の合計] を100%として、上記特定の構造を持つ各不飽和二糖の割合を示したものであり、当該数値は酵素消化前のグリコサミノグリカン誘導体の硫酸基の位置及び数を反映するものである。

【0015】

【化6】



【0016】

【表1】

構造式の置換基

R ²	R ³
COCH ₃	H
COCH ₃	H
SO ₃ H	H
COCH ₃	SO ₃ H
SO ₃ H	H
SO ₃ H	SO ₃ H
COCH ₃	SO ₃ H
SO ₃ H	SO ₃ H

カッコ内は硫酸基の結合位置を示す。上記二糖分析法において生成する一般式（7）の構造を有する不飽和二糖は、分析対象となるグリコサミノグリカンの基本骨格を構成する一般式（3）及び（4）のヘキスロン酸残基と一般式（6）のヘキソサミン残基が結合した一般式（2）中の（A）-（B）の構造より生ずる。

【0018】本発明のグリコサミノグリカン誘導体は、グリコサミノグリカンより誘導された特定の物性を有する新規多糖類であるが、便宜上グリコサミノグリカン誘導体として本明細書中で記載する。本発明のグリコサミ

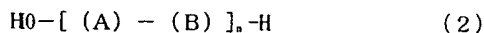
ノグリカン誘導体は、試験法1に記載の二糖分析法による測定値から算出した二糖体組成のうち Δ DiHS-tri (U, 6, N)Sのモル%が0~10%、好ましくは0~5%、より好ましくは2~4%であり、 Δ DiHS-di (6, N)Sのモル%が95~70%、好ましくは90~80%、より好ましくは82~87%であり、更に Δ DiHS-NSのモル%が5~20%、好ましくは10~15%、より好ましくは11~14%である硫酸化多糖であり、且つその重量平均分子量は試験法2に記載の分子量の測定法による測定値が9,000~13,000Da、より好ましくは10,000~12,000Daである。

【0019】また、本発明のグリコサミノグリカン誘導体はヘキシサミンとヘキシロン酸の繰り返し単位で形成される構造を基本骨格とするグリコサミノグリカン誘導体である。前記ヘキシサミンとしてはグルコサミン、ガラクトサミン、マンノサミンなどが挙げられるが、D-グルコサミンが好ましい。ヘキシサミンはアミノ基又は6位ヒドロキシル基のうち的一方あるいは両方が硫酸化されている、すなわちN-硫酸化及び/又は6-O-硫酸化されていることが好ましいが、硫酸基を持たないヘキシサミンであっても何ら支障はない。ヘキシロン酸としてはD-グルクロン酸、L-イズロン酸などが挙げられる。ヘキシロン酸の一部はその2位と3位の炭素原子間で開裂し、好ましくは酸化的開裂反応後、該開裂部位が還元されており、開裂していないヘキシロン酸は、その2位のヒドロキシル基の一部又は全部が硫酸基で置換されていることが好ましい。そして基本骨格中の繰り返し単位の中に上記開裂されたヘキシロン酸とヘキシサミンが結合した前記一般式(1)で表される構造単位がグリコサミノグリカン誘導体1分子あたり1以上存在する。

【0020】また、本発明グリコサミノグリカン誘導体は、標準血漿に最終濃度3 μ g/mlで添加して測定した際の活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)が50秒以下である特性を有する。このような特性を有する本発明グリコサミノグリカン誘導体は下記の一般式(2)で示すことができる。

【0021】

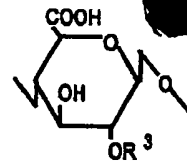
【化7】



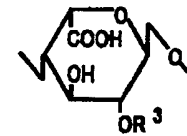
【0022】ただし、(A)は下記一般式(3)で示されるグルクロン酸残基、下記一般式(4)で示されるイズロン酸残基、又は下記一般式(5)で示される開裂されたヘキシロン酸残基であり、

【0023】

【化8】

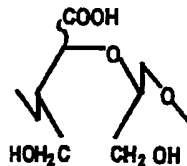


(3)



(4)

10

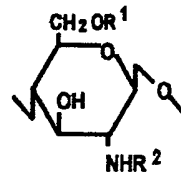


(5)

【0024】(B)は下記一般式(6)で示されるヘキシサミン残基をそれぞれ示す。

【0025】

20 【化9】



(6)

【0026】ただし、一般式(3)~(6)においてR¹及びR²はそれぞれ独立にH又はSO₃Hであり、R²はそれぞれ独立にCOCH₃又はSO₃Hを示す。また、一般式(2)において、nは15 \leq n \leq 40、好ましくは20 \leq n \leq 30を充たす整数であり、(A)の少なくとも一つは一般式(5)の残基であり、(B)の少なくとも一つは一般式(6)においてR¹及びR²の少なくとも一方がSO₃Hで示されるヘキシサミン残基である。

【0027】上記本発明のグリコサミノグリカン誘導体(以下、本発明物質と称することもある)は、ヘキシサミンとヘキシロン酸を基本骨格とし、硫酸基を有する糖鎖の誘導体であれば、前記(a)~(d)の特性を充足する限り特に限定はされないが、ヘパリン硫酸又はヘパリンの誘導体が好ましく、特にヘパリンの誘導体が好ましい。本発明物質は、一部のヘキシロン酸が2位と3位の炭素原子間で開裂した構造である。また、本発明物質を構成する開裂していないヘキシロン酸の2位のヒドロキシル基の硫酸化率は10%未満であり、5%未満であることが好ましい。本発明グリコサミノグリカン誘導体は上記一般式(2)で示すことができ、式中nは15 \leq n \leq 40、好ましくは20 \leq n \leq 30、すなわち30~80糖残基、好ましくは40~60糖残基を有する多糖である。また、本発明物質の抗血液凝固活性は低く、健康人から採取した標準血漿に最終濃度3 μ g/mlで添加して測定した際の活性化

部分トロンボプラズミン時間 (APTT) が、特に50秒以下であることが好ましい。

【0028】本発明物質のグリコサミノグリカン誘導体は、実施例中のWistar系ラット大脳皮質神経細胞の初代培養細胞を使用した神経突起伸張活性試験において、本発明物質を培地中の最終濃度 $1\mu\text{g/ml}$ ~ $10\mu\text{g/ml}$ の濃度範囲で添加、培養を行った場合に、標準ヘパリンと比して1.5倍以上の活性を有することが好ましい。また、本発明物質は実施例に記載の方法で測定したシアリダーゼ阻害活性、特にインフルエンザウイルスのシアリダーゼ阻害活性が、公知のシアリダーゼ阻害剤や標準ヘパリンに比し著しく強いものが好ましい。

【0029】本発明製造方法

本発明製造方法は、ヘキシサミンとヘキシロン酸の繰り返し単位構造を基本骨格とし、ヘキシロン酸の一部はその2位と3位の炭素原子間で開裂、好ましくは酸化的開裂反応による開裂後、更に該開裂部位が還元され、未開裂のヘキシロン酸の2位の硫酸基の大部分が脱硫酸化されているグリコサミノグリカン誘導体を製造するもので、下記の①及び②の工程を含むことよりなる製造方法である。

① ヘキシサミンとヘキシロン酸の繰り返し単位構造を基本骨格とする硫酸化グリコサミノグリカンを開裂処理し、その2位に硫酸基を有しないヘキシロン酸の少なくともその一部を2位と3位の炭素原子間のみを開裂する工程、

② ヘキシロン酸の2位の硫酸基を特異的に除去しうる脱硫酸化手段により工程①の生成物を脱硫酸化処理し、2位に硫酸基を有するヘキシロン酸の2位の硫酸基の90%以上を脱硫酸化する工程。

【0030】1. 硫酸化グリコサミノグリカン (原料)
本発明方法の硫酸化グリコサミノグリカンは、ヘキシサミンとヘキシロン酸の繰り返し単位構造を基本骨格とし、2位に硫酸基を有しないヘキシロン酸を少なくとも1以上構成単糖として有している多糖である。前記硫酸化グリコサミノグリカンとしては、例えばヘパリン、ヘパラン硫酸などが挙げられ、好ましいが、特に上記ヘキシロン酸の2位ヒドロキシル基の硫酸化率が高く、下記工程①によるヘキシロン酸の開裂が適度に抑えられることからヘパリンが好ましい。

【0031】2. 工程①：ヘキシロン酸の開裂処理
本発明方法における工程①に記載の「開裂処理」とは、硫酸化グリコサミノグリカンの構成単糖中、2位に硫酸基を有しないヘキシロン酸の2位と3位の炭素原子間のみを特異的に開裂させる処理であれば特に限定はされないが、具体的には酸化・還元反応処理が挙げられる。当該酸化・還元反応処理は、酸化剤を用いた酸化反応により上記特定のヘキシロン酸の2位と3位の炭素原子間を開裂して酸化的開裂反応生成物を得た後、ヘキシロン酸の開裂部に生じたアルデヒド基を還元反応処理により還元

する方法によって行われる。上記酸化剤としては本反応の目的を達成することが可能な物質であれば特に限定はされないが、過ヨウ素酸塩や過酸化水素などが挙げられ、その中でも特に過ヨウ素酸塩が好ましい。過ヨウ素酸塩としては過ヨウ素酸ナトリウム、過ヨウ素酸カリウム等の過ヨウ素酸アルカリ金属塩が挙げられるが、過ヨウ素酸ナトリウムが好ましい。

【0032】上記開裂処理として酸化・還元反応処理を行う場合は、例えば過ヨウ素酸ナトリウムを $0.01\sim 0.3\text{M}$ 、好ましくは $0.05\sim 0.2\text{M}$ の濃度で含有し、上記硫酸化グリコサミノグリカンを $0.5\sim 10\%$ 、好ましくは $1\sim 7\%$ の濃度で含有する溶液中において、 pH は $3\sim 7$ 、好ましくは $4\sim 5$ 、処理温度は $0\sim 37^\circ\text{C}$ 、好ましくは $0\sim 10^\circ\text{C}$ 、さらに好ましくは 4°C の条件下、1日以上、好ましくは3日間酸化反応を行う。酸化反応後、過剰の過ヨウ素酸ナトリウムを、 $100\sim 500\text{mM}$ のエチレングリコールあるいはグリセリンなどを添加することによって還元反応により分解する。その後、必要に応じて、蒸留水による透析を行ったり、さらに凍結乾燥あるいはエタノール沈澱法などの方法を用いてヘキシロン酸の酸化的開裂反応生成物を得ることができる。

【0033】その後、更に過ヨウ素酸酸化によってヘキシロン酸の開裂部に生成したアルデヒド基を還元してヘキシロン酸の酸化・還元反応処理を完了する。前記アルデヒド基の還元は、還元剤として水素化ホウ素アルカリ金属塩又は水素化アルミニウムリチウム等を使用していることができるが、還元剤は特に水素化ホウ素アルカリ金属塩が好ましく、水素化ホウ素ナトリウムが最も好ましい。還元剤として水素化ホウ素ナトリウムを用いる場合、例えば $0.1\sim 0.5\text{M}$ 、好ましくは 0.2M の水素化ホウ素ナトリウムを含む $\text{pH}8.5\sim 9.5$ の $1\sim 20\%$ 、好ましくは $5\sim 10\%$ の上記酸化的開裂反応生成物 (w/v) を含む溶液を 4°C 、3時間反応させることによって実施することが好ましい。更に、過剰の水素化ホウ素ナトリウムを反応液の pH を $4\sim 5$ に調節することによって分解し、蒸留水に対する透析によって還元反応を停止して過ヨウ素酸酸化・還元反応生成物のナトリウム塩を得ることが好ましい。

【0034】特に原料としてヘパリンを使用した場合は、過ヨウ素酸塩と水素化ホウ素アルカリ金属塩を使用する酸化・還元反応処理による開裂処理を行うことが好ましく、当該処理によりヘパリンの過ヨウ素酸化還元生成物である過ヨウ素酸化・還元ヘパリンが得られる。上記硫酸化グリコサミノグリカンの構成単糖中のヘキシロン酸を特異的に開裂させる処理によって得られる硫酸化グリコサミノグリカンのヘキシロン酸開裂物は、次工程②において少なくとも一部のヘキシロン酸の2位の硫酸基が脱硫酸化される。

【0035】3. 工程②：脱硫酸化処理

本発明方法における工程②に記載の「脱硫酸化処理」とは、工程①で生じた「硫酸化グリコサミノグリカンのヘ

キスロン酸開裂物」を構成する2位に硫酸基を有するヘキスロン酸において、当該2位の硫酸基を選択的に脱硫酸化する処理（選択的脱硫酸化処理）であれば特に限定されず実施されるが、完全に脱硫酸化することを目的とする場合にはアルカリ性条件下で行う方法、すなわち、アルカリを使用する加水分解反応による方法で、特に水酸化ナトリウム、水酸化カリウムなどのアルカリ金属水酸化物水溶液又は水酸化マグネシウム、水酸化カルシウムなどのアルカリ土類金属水酸化物水溶液、好ましくはアルカリ金属水酸化物水溶液、特に好ましくは水酸化ナトリウム水溶液に上記工程①で得られた硫酸化グリコサミノグリカンのヘキスロン酸開裂物を溶解して溶液とした後、ただちに凍結して凍結乾燥を行う工程を含む方法が好ましい。

【0036】具体的には硫酸化グリコサミノグリカンのヘキスロン酸開裂物の溶液を、好ましくは氷冷（0℃）～室温（24℃）において0.0125～0.2Nのアルカリ金属水酸化物水溶液又はアルカリ土類金属水酸化物水溶液にグリコサミノグリカンのヘキスロン酸開裂物を溶解して調製した溶液を、凍結乾燥する。その後更に、この凍結乾燥物が1～2.5M、好ましくは2Mとなるように、再度アルカリ金属水酸化物水溶液又はアルカリ土類金属水酸化物水溶液（0.0125～0.2N）へ溶解し、その後、酸、好ましくは弱酸、さらに好ましくは酢酸などのカルボン酸によってpHを8～10に調整した後、ただちに蒸留水に対して1日以上、好ましくは2日間透析を行い、凍結乾燥あるいはエタノール沈澱法を行うことが好ましい。硫酸化グリコサミノグリカンのヘキスロン酸開裂物の脱硫酸化は、通常、開裂していないヘキスロン酸の2位の硫酸基の70%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上が除去されるように行う。

【0037】本発明方法において原料の硫酸化グリコサミノグリカンとしてヘパリンを使用し、工程①で得られる過ヨウ素酸酸化・還元ヘパリンを用いて、上記選択的脱硫酸化処理を行った場合、本発明の選択的2-O-脱硫酸化過ヨウ素酸酸化・還元ヘパリンが得られる。出発原料としてのヘパリンから、上記工程①の開裂処理及び②の脱硫酸化処理により本発明のグリコサミノグリカン誘導体を製造する反応工程の概略図を図1に示す。図中、(a)はヘパリンの模式図、(b)はヘキスロン酸の酸化的開裂反応によりアルデヒド基が生成した反応生成物、(c)は(b)のアルデヒド基を還元反応処理した還元反応処理物、(d)は2-O-硫酸基を選択的に脱硫酸化した本発明のグリコサミノグリカン誘導体を意味する。

【0038】本発明組成物1

本発明組成物1は本発明物質であるグリコサミノグリカン誘導体又はその薬理学的に許容しうる塩を有効成分として含有する神経疾患治療剤である。神経突起伸張活性を有するグリコサミノグリカン誘導体は、その活性を利用する医薬組成物、例えば中枢神経の障害（例えばアル

ツハイマー症及び虚血性痴呆症など）又は末梢神経の障害（例えば糖尿病性神経障害、アルコール性神経障害、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、外傷又は医薬品の副作用による末梢神経損傷、及びギランバレー症候群など）に対する神経疾患治療剤として有用である。また、本発明組成物1の有効成分である本発明グリコサミノグリカン誘導体は、神経細胞の生存維持、シナプス機能の維持、軸索機能の維持に関与する細胞膜上のガングリオシドのシアリダーゼによる分解を抑制し、神経変性に伴う神経機能の低下を防止することからも、神経機能低下抑制剤として治療剤及び予防剤に利用可能である。

【0039】本発明組成物2

本発明組成物2は本発明物質であるグリコサミノグリカン誘導体又はその薬理学的に許容しうる塩を有効成分として含有するシアリダーゼ阻害剤である。

【0040】シアリダーゼ阻害活性を有する本発明物質のグリコサミノグリカン誘導体は、その活性を利用するシアリダーゼ阻害剤として利用することが可能である。特にウイルスのシアリダーゼを阻害することによってウイルスの増殖を阻害することができ、抗ウイルス剤、特に抗インフルエンザ治療薬として使用しうる。特に、シアリダーゼ阻害活性を有し、インフルエンザ治療薬として使用されている公知のシアル酸誘導体と比較して、本発明物質は格段に優れたシアリダーゼ阻害活性を示す。

【0041】本明細書中において、「治療薬」とは、患者の状態を健全な状態へ改善する薬剤や、疾病を緩和するための薬剤のみならず、疾病への感染、罹患を防ぐ「予防のための薬剤」の概念をも包含する。

【0042】本発明組成物1及び2の有効成分として利用されるグリコサミノグリカン誘導体の薬理学的に許容されうる塩としては、アミン塩、第四級アンモニウム塩、アルカリ金属塩及びアルカリ土類金属塩のうち薬理学的に許容されるものが挙げられ、具体的には例えば、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩等を例示することができるが、特にアルカリ金属塩であるナトリウム塩及びカリウム塩などが好ましく、その中でも生体への親和性などの面からナトリウム塩が最も好ましい。

【0043】本発明のグリコサミノグリカン誘導体は、標準ヘパリンに比して抗血液凝固活性が低い特性を呈するものである。特に好ましいグリコサミノグリカン誘導体は、後記試験法4に記載の方法に従い、測定溶液中での濃度（最終濃度）を3μg/mlとしてAPTTを測定すると、測定値が50秒以下となることが最も好ましい。また、医薬組成物としての本発明組成物に使用するグリコサミノグリカン誘導体（本発明物質）は後述のトロンビン時間（以下「TT」と記載する）測定法により算出したTT活性と、APTT測定法により算出したAPTT活性の少なくとも一方が、標準ヘパリンと比較して5%以下となることが好ましい。さらに好ましいものは、TT活性、AP

TT活性が共に標準ヘパリンと比較して3%以下であり、両活性の関係が $0 \leq \text{TT活性} / \text{APTT活性} \leq 0.5$ であるところの、相対的にTT活性が低いものは、医薬組成物に用いた場合、出血活性が低いことが期待され有用である。本明細書中における標準ヘパリンとは、実施例に記載された標準ヘパリンと同一の物質である。

【0044】本発明物質を有効成分として含有する医薬組成物を、生体内に投与する際の剤形及び投与経路としては、対照となる疾患の性質や重篤度に応じて適宜選択することができる。例えば、それらをそのまま、又は他の薬理学的に許容されうる担体、賦形剤、希釈剤等と共に医薬組成物製剤（例えば、注射剤、坐剤、錠剤、カプセル剤、液剤、軟膏、ゲル剤）として、温血動物（例えば、ヒト、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、イヌ、ネコ、ウマ等）に対して、非経口的又は経口的に安全に投与することができる。

【0045】上記神経疾患治療剤の投与形態としては非経口的投与が好ましく、前記投与形態に適した形態としては注射剤が挙げられ、その投与方法は注射あるいは点滴などによる静注が好ましい態様として挙げられるが、これに限定されるものではない。

【0046】インフルエンザ治療薬の投与形態としては経口投与及び非経口投与いずれの投与形態も適宜選択することが可能である。経口投与に適した剤形としては例えば散剤、顆粒剤、錠剤、カプセル剤、エアゾール剤及びスプレー（噴霧）剤等が挙げられ、また非経口投与に適した剤形としては液剤が挙げられる。更に、特にインフルエンザ治療薬を予防のために使用する形態としては経口投与により投与される液剤も好ましく、該液剤をスプレー等の手段を用いて投与する形態が好ましい形態として挙げられるが、これらに限定されるわけではない。

【0047】上述の医薬組成物の有効成分であるグリコサミノグリカン誘導体の配合量並びに投与量は、その製剤の投与方法、投与形態、使用目的、患者の具体的症状、患者の体重等に応じて個別に決定されるべき事項であり、特に限定はされないが、患者に投与されるグリコサミノグリカン誘導体量は静注では1日当たり概ね100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~ 100mg/kg程度を例示することができる。また、上記製剤の投与回数は1日1回程度でも可能であり、1日2 ~ 4回、又はそれ以上の回数に分けて投与することもできる。また、例えば点滴などにより連続的に投与することも可能である。

【0048】なお、上述した医薬組成物の有効成分であるグリコサミノグリカン誘導体は、後述する実施例において細胞に対する毒性は見られなかった。ヘパリンのマウス（雄、雌）における急性毒性試験によるLD₅₀は、経口投与で5,000mg/kg以上、皮下又は腹腔内投与で、2,500mg/kg以上、静注で1,000mg/kg程度であることが知られている。本発明の医薬組成物の有効成分であるグリコサ

ミンと比して共に3%未満と極めて低いため、このことから医薬組成物の有効成分であるグリコサミノグリカン誘導体（本発明物質）の安全性の高さが裏付けられる。

【0049】

【実施例】本発明を実施例により更に具体的に説明するが、本発明はその要旨を超えない限り以下の実施例に限定されるものではない。なお、実施例における試験法は以下の通りである。

【0050】試験法 1

【酵素消化による二糖分析】本発明物質及び標準ヘパリンの硫酸基の位置の分析は、次のようにして行った。すなわち、それぞれのグリコサミノグリカンを酵素消化し、生成した不飽和二糖（前記一般式(7)）を高速液体クロマトグラフィー（HPLC）で分析した〔新生物化学実験講座3、糖質II（東京化学同人刊、1991）p49-62に記載の「2・8グリコサミノグリカン分解酵素とHPLCを組み合わせた構造解析」参照〕。各不飽和二糖のピーク面積を計算して、全面積に対するピーク面積をパーセントとして表した。

【0051】（1）標準ヘパリン及び本発明物質の分解酵素による消化

新生物化学実験講座3、糖質II p. 53-59に記載の方法により消化酵素で分解した。標準ヘパリン及び本発明物質各1.0mgを2mM酢酸カルシウムを含む20mM酢酸ナトリウム（pH7.0）220 μl に溶解して、20mUのヘパリチナーゼ、20mUのヘパリチナーゼI及びIIを加えて、37℃で2時間反応させた。

【0052】（2）HPLCによる分析

標準ヘパリン又は本発明物質の分解酵素による消化を行った後の溶液50 μl を、HPLC（医理化、モデル852型）を用いて分析した。イオン交換カラム（Dionex社、CarboPac PA-1カラム4.0mm×250mm）を使用し、232nmでの吸光度を測定した。不飽和二糖スタンダード（生化学工業（株）製）を基準とし（Yamada, et al., J. Biol. Chem., 270, 8696-8706, (1995)）、流速1ml/分で、塩化リチウムを用いたグラジエント系（50mM→2.5M）を用いる方法に準拠した（Kariya, et al., Comp. Biochem. Physiol., 103B, 473, (1992)）。

【0053】試験法 2

【分子量測定】標準ヘパリン又は本発明物質の1%溶液5 μl をHPLCによるゲルろ過で分析した。カラムはTSKgel - (G4000+G3000+G2500) PWX（東ソー、7.8mm×30cm）を用い、0.2N塩化ナトリウムで、40℃、0.6ml/分の流速で展開した。検出には示差屈折計（島津製作所、AI D-2A）を用いた。表-1における重量平均分子量はヘパリンの分子量標準品を対照として求めた（Kaneda et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 220, 108-112(1996)）。

【0054】試験法 3

【神経突起伸張活性の測定】妊娠17日のWistar系ラット

(日本SLC社)より胎児を無菌的に取り出した。さらに、胎児より脳を取り出し、無硫酸化DMEM培地(無水CaCl₂ 500mg、Fe(NO₃)₃/9H₂O 0.25mg、KCl 1000mg、MgCl₂ 193.3mg、NaHCO₃ 9250mg、NaH₂PO₄/H₂O 312.5mg、フェノールレッド 37.5mg、ピルビン酸ナトリウム 275mg、MEMアミノ酸 100ml(ギブコ No. 11130-051)、L-グリシン 75mg、L-グルタミン 1460mg、L-セリン 105mg、MEMビタミン溶液 100ml(ギブコ No. 11120-052)、NaCl15150mg、D-グルコース 11250mgに滅菌蒸留水を加えて2.5LとしてpHを7.2に調整)中で小脳、中脳、間脳及び髄膜を取り除き大脳皮質を得た。

【0055】10匹分の大脳皮質を60mmのディッシュ上で安全かみそりで縦横各々100回細切し、10mlリン酸緩衝生理食塩液(PBS)を2回加えて大脳皮質接片を50mlのフアルコンチューブに分注し、11mlの無硫酸化DMEM培地を加えた。軽く振盪することにより均一に懸濁しながら、0.5mlずつ0.1%ポリエチレンイミンコートした24穴プレート(底面積2cm²)にまいた。培養開始2時間後に100μlを抜き取り、培地中の最終濃度の10倍の濃度で被検物質を含む50μlのPBS、50μlの400μMの塩素酸/無硫酸化DMEM培地を添加した。2日間37℃5%CO₂条件下で培養した後、1%グルタルアルデヒド/PBS 500μlをゆっくり重層して室温で20分間固定した。サクシオンで上清を除去した後、0.5ml PBSをゆっくり重層しすぐにサクシオンで除去した。20%ギムザ液/リン酸カリウム緩衝液を重層して室温に2時間放置した。サクシオンで上清を除去した後、0.5mlのPBSを加えた。光学顕微鏡下40倍でウェル全視野に存在する50~200μmの大脳皮質神経細胞集塊100個のうち突起伸張が観察されたものを計数して割合(%)を算出した。

【0056】試験法4

[APTT及びTTの測定] APTTの測定のため、ラットの下大動脈より3.2%クエン酸1/10容量で採取し、血液を1,000×g、10分間遠心分離して得た血漿100μlと様々な濃度の各サンプル100μlとを測定用カップに入れ、37℃で1分間保温した。その後、あらかじめ37℃に保温しておいたアクチン(商品名:吉富製薬(株))100μlを添加し、さらに2分間保温した。次いで、37℃に保温しておいた0.02M CaCl₂溶液100μlを添加し、この時より凝固が起こるまでの時間を血液凝固自動測定装置(KC-10A:アメリング社製)で測定した。また表-2において、本発明物質及び標準ヘパリンのAPTTが100秒となる培地中の最終濃度を求め、標準ヘパリンの前記濃度を本発明物質の前記濃度を基準として百分率で算出し、この数値(%)を本発明物質のAPTT活性とした。

【0057】TTの測定のため、上記ラット血漿100μlと様々な濃度の各サンプル100μlとを測定用カップに入れ、37℃で1分間保温した。その後、37℃に保温したトロンビン(10 U/ml)100μlを添加し、この時より凝固が起こるまでの時間を上記血液凝固自動測定装置で測定

した。表-2において、本発明物質及び標準ヘパリンのTTが100秒となる培地中の最終濃度を求め、標準ヘパリンの前記濃度を本発明物質の前記濃度を基準として百分率で算出し、この数値(%)を本発明物質のTT活性とした。

【0058】[本明細書における標準ヘパリン]

以下に示す物性のヘパリンを標準ヘパリンとした。

(1) 上記試験法1に記載の二糖分析法による測定値から算出した標準ヘパリンの二糖体組成は表-3に記載のとおり、ΔDiHS-OS: 4.1%、ΔDiHS-NS: 3.4%、ΔDiHS-6S: 3.7%、ΔDiHS-US: 2.6%、ΔDiHS-di(6,N)S: 12.7%、ΔDiHS-di(U,N)S: 7.6%、ΔDiHS-di(U,6)S: 1.7%、ΔDiHS-tri(U,6,N)S: 64.2%であり、この結果から23.9%のウロン酸の2位には硫酸基が存在しないことが示されている(%は全てモル%比を表す)。

(2) 抗血液凝固活性が160 IU/mgである。

(3) 重量平均分子量が11,000~14,000 Daである。

【0059】実施例1(製造例)

1. 標準ヘパリンの過ヨウ素酸酸化・還元によるヘキスロン酸の部分開裂処理

ヘパリンナトリウム塩(重量平均分子量:13,700 Da、Syntex社製Lot No. 40210910:標準ヘパリン)1.3gを、過ヨウ素酸ナトリウムの存在下で酸化した。すなわちこの酸化反応は、50mlの0.05Nの過ヨウ素酸ナトリウム、50mMの酢酸ナトリウムを含んだpH5の溶液中で、ヘパリンナトリウム塩を4℃、3日間酸化処理して行った。酸化処理後、過剰の過ヨウ素酸を最終濃度250mMのグリセリンを加えることで還元分解し、蒸留水に対して2日間透析し、その後凍結乾燥することにより1.2gの過ヨウ素酸酸化ヘパリンを得た。この過ヨウ素酸酸化ヘパリンの生成時に生じたアルデヒド基を、30mlの0.2N水素化ホウ素ナトリウム、0.25N炭酸水素ナトリウムを含んだpH9の該酸化ヘパリン1.2gを含む溶液を4℃、3時間反応させることでこの過ヨウ素酸酸化ヘパリンのアルデヒド基を還元した。過剰の水素化ホウ素ナトリウムは、氷酢酸で反応液のpHを5に調節し、30分間室温で放置することで分解し、ふたたび5Nの水酸化ナトリウムでpHを9に調節した後、蒸留水への2日間の透析と凍結乾燥により、1.1gの過ヨウ素酸酸化・還元ヘパリンのナトリウム塩を得た。

【0060】2. 過ヨウ素酸酸化・還元ヘパリンの部分2-O-脱硫酸化

上記1で得た1.1gの過ヨウ素酸酸化・還元ヘパリンのナトリウム塩を、20mlの0.05Nの水酸化ナトリウム水溶液に溶解し、室温にて20分間放置した。この溶液を凍結乾燥して選択的に2位の硫酸基を脱硫酸化し、凍結乾燥パウダーを10mlの1N水酸化ナトリウム溶液で溶解し、20%酢酸溶液でpH9に調節し、30分間室温に放置した。その後、蒸留水に対して2日間透析し、再び凍結乾燥し、脱硫酸化された過ヨウ素酸酸化・還元ヘパリン(選択的2-O-脱硫酸化過ヨウ素酸酸化・還元ヘパリン)のナトリウ

ム塩0.8gを得た。試験法2に従い、HPLCにより本発明物質の重量平均分子量を測定し、その結果を図2及び表-1に示した。

【0061】

【表2】

表 - 1

	平均分子量(MW)
標準ヘパリン	13,700
本発明物質	11,100

【0062】3. 神経突起伸長活性、APTT、TTの測定
表-1に記載の標準ヘパリン及び上記2により得られた本発明物質、更に上記1により得られた過ヨウ素酸化

表-2

	神経突起伸長活性	APTT (3 μ g/ml)	APTT 活性	TT 活性	TT 活性/APTT 活性
標準ヘパリン	15.0(10 μ g/ml)	248 秒	100	100	1
本発明物質	29.7(10 μ g/ml)	32 秒	2	0.37	0.185

【0064】APTT活性と比較してTT活性が低い物質は、医薬品として投与した際に抗血液凝固活性が低く、安全性が高いことが知られており、本発明物質がそのような物質であることが明らかとなった。

【0065】更に、得られた本発明物質について、上記

表-3

	Δ DHS-							
	OS	NS	6S	US	(6,N)S	(U,N)S	(U,6)S	(U,6,N)S
標準ヘパリン	4.1	3.4	3.7	2.6	12.7	7.6	1.7	64.2
本発明物質	0.0	11.9	0.0	0.0	84.2	0.0	0.0	3.9

【0067】4. 神経細胞死抑制活性の測定
本発明物質の運動神経細胞に対する細胞死抑制活性を測定した。すなわち、予め0.1%ポリエチレンイミンで処理した96穴マルチプレートにNSC-34細胞 (Cashman氏(トロント大学)より恵与：マウスの運動神経由来培養細胞株) 1×10^5 個/mlを含む無血清のDMEM培地0.09mlを添加して培養を行う。2時間の培養後、本発明物質の100、1000、10000 μ g/mlの水溶液10 μ lを添加した(それぞれの培地中の最終濃度は10、100、1000 μ g/ml)。その後、46時間培養を継続し、MTT法を用いて生存細胞数を血球計数板を用いて測定した。2時間の培養後の生存細胞数と比較して、本発明物質を添加しなかった対照の48時間培養後の死細胞数を100%として、本発明物質を添加した際の死細胞数との差(細胞死から救済された細胞数)の割合を百分率として算出した(図6)。

【0068】その結果、本発明物質の100及び1000 μ g/mlの水溶液を添加した系(培地中の最終濃度は10及び100

・還元ヘパリンのそれぞれについて、上記試験法3によりその神経突起伸長活性を調べ図3に示した。その結果、本発明物質を10 μ g/mlで加えた際に大幅な神経突起伸長活性が見られた。さらに、上記標準ヘパリン及び本発明物質について、試験法4によりAPTT及びTTを調べ、その結果を図4に示した。また、試験法4に則りAPTT活性及びTT活性を算出し、TT活性/APTT活性を算出した。更に、標準ヘパリン及び本発明物質の最終濃度を3 μ g/mlに調整して試験法4に則りAPTTを測定した。これら各種測定の結果を標準ヘパリン及び本発明物質について表-2に記載した。

【0063】

【表3】

試験法1による二糖分析を行い、その結果を図4に示し又その測定値から二糖体組成を算出して結果を表-3に記載した。

【0066】

【表4】

μ g/ml)において、顕著に細胞死を抑制し細胞を救済する活性が観察された。100 μ g/mlの水溶液を添加した際の細胞死を起こした細胞数は、標準ヘパリンと比較して、約半数であり、約半数の細胞が細胞死から救済されることが明らかとなった。また、生存した細胞においては、中枢神経由来の細胞と同様に神経突起の伸長促進活性が観察された。

【0069】5. シアリダーゼ阻害活性の測定

標準ヘパリン、本発明物質、及び公知のシアリダーゼ阻害剤であるNeuAc2en (2-デオキシ-2, 3-デヒドロ-N-アセチルノイラミン酸)につき、シアリダーゼ阻害活性を測定した。

【0070】5.1 基質の調製

GM2ガングリオシド(ヤマトロン社製)1mgを15mlのガラスチューブへ入れ、0.8mlの蒸留水を添加してソニケーションにより溶解させた。そして、この溶液に0.1mlPdCl₂溶液(PdCl₂を25mg/mlで蒸留水に添加した後、30分間ソ

ニケーションを行い、これを100×gで遠心分離して得られる上清画分)を添加して撹拌した。この溶液に0.1m lの1N NaOH、40μ lのNaBH₄ (NEN社製: 100mCi/mmol、1M NaOH)を添加して撹拌した後、窒素ガスでチューブ内に置換した後、室温で24時間撹拌し、ミクロスパーテルに一掻きのNaBH₄を添加して更に3時間室温で撹拌した。その後、1M酢酸約0.6mlを徐々に加えて反応を終了させ、この反応液をAG50W-X8 (バイオラッド社製: 樹脂量3ml、メタノールにより膨潤)のミニカラムに通塔し、10mlのメタノールにより完全に溶出させる。この溶出した基質を窒素ガスで乾固させ、基質の[³H]GM2を調製した。

【0071】5.2 シアリダーゼ活性の測定

上記5.1で調製した基質[³H]GM2 (15nmol)、1% Triton X-100 (10μ l)、0.1M酢酸ナトリウム/酢酸緩衝液 (40μ l)、NSC-34細胞 (シアリダーゼを発現している運動神経由来培養細胞株) のホモジナイズ液 (10μ l、100μ gタンパク)、蒸留水10μ l、ならびに本発明物質又は標準ヘパリンの水溶液 (10μ g/ml) を10μ l添加して、37℃で1時間インキュベートした。インキュベート後、5mlの蒸留水を添加し、Sep-pak C18カートリッジカラム (Waters社製) に通塔し、メタノール (3ml)、その後クロロホルム: メタノール混合液 (1:1 (v/v)、3ml) により溶出した。溶出液を、DEAE-セファデックスA-25カラム (ファルマシア社製: 樹脂1ml、メタノールにより膨潤) に通塔し、クロロホルム: メタノール混合液 (1:1 (v/v)、3ml) により溶出させ、溶出液を乾固させた後、液体シンチレーションカウンターで放射能の量を測定して比較した。標準ヘパリン又は本発明物質の代わりに10μ lの蒸留水を添加した対照の放射能の量を100%とした (図7)。その結果、本発明物質は、標準ヘパリンと比較して、よりガングリオシドを分解するシアリダーゼ阻害活性が強いことが明かとなり、シアリダーゼ活性の上昇及び/又はガングリオシドの減少を伴う疾病に適用できることが示された。

【0072】更に、上記測定において、10μ g/mlの本発明物質及び標準ヘパリンの10μ lの代わりに、本発明物質 (10、100、1000μ g/ml) 又はNeuAc2en (10、100、1000μ g/ml) の水溶液10μ lを用いて同様にシアリダーゼ活性を測定した (図8)。その結果、本発明物質は、NeuAc2enと比較して、よりシアリダーゼ阻害活性が強いことが明らかになった。

【0073】実施例2 (製剤例)

(1) 注射剤

前記実施例1において製造した本発明物質 (30mg/ml) を、終濃度5mg/mlとなるよう5%マンニトール水溶液に溶解し、これを無菌濾過した後、2mlずつアンプルに分注して注射剤を製造した。

【0074】(2) スプレー剤

前記実施例1において製造した本発明物質 (30mg/ml)

を、終濃度1mg/mlとなるようPBSに溶解し、これを無菌濾過した後、20mlずつ、滅菌したスプレー容器に充填して、スプレー剤を製造した。

【0075】(3) 錠剤

前記の本発明物質の凍結乾燥物100mg、乳糖670mg、バレイショデンブレン150mg、結晶セルロース60mg及び軽質無水ケイ酸50mgを混合し、これにヒドロキシプロピルセルロース30mgをメタノールに溶解した溶液 (ヒドロキシプロピルセルロース10重量%) を添加して練合造粒した。次にこれを径0.8mmのスクリーンで押し出して顆粒にし、乾燥した後、ステアリン酸マグネシウム15mgを添加して圧縮成型し、200mgの錠剤を製造した。

【0076】(4) カプセル剤

前記の本発明物質の凍結乾燥物100mg、バレイショデンブレン150mg、軽質無水ケイ酸50mg、ステアリン酸マグネシウム10mg及び乳糖765mgを均一に混合し、この混合物を200mgずつ分取して硬カプセルに充填してカプセル剤を製造した。

【0077】(5) 軟膏剤

前記の本発明物質の凍結乾燥物100mg、鉱油4g、石油ゼリー8g、混合メチル/プロピルパラバン60mg、非イオン性界面活性剤1g及び精製水30gを均一に混合し、この混合物を容器に充填して軟膏剤を製造した。

【0078】

【発明の効果】本発明の新規グリコサミノグリカン誘導体は、抗血液凝固活性が低く、優れた神経突起伸張活性を有するので、当該物質を有効成分として含有する中枢神経或いは末梢神経などの神経疾患に対する有用な医薬組成物を提供することができる。また、本発明の新規グリコサミノグリカン誘導体は、強力なシアリダーゼ阻害活性を有するため、当該物質を有効成分として含有する抗ウイルス剤を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、本発明グリコサミノグリカン誘導体の製造工程の一例を示す模式図である。

【図2】図2は標準ヘパリン (a) 及び本発明物質 (b) のHPLCによる溶出チャート図である。

【図3】図3は標準ヘパリン、本発明物質及び過ヨウ素酸酸化・還元ヘパリンの培地中の濃度による神経突起伸張活性の変化を示す図である。図中、縦軸は神経突起伸長活性 (%)、横軸は培地中の濃度 (μg/ml) を示す。

【図4】図4は標準ヘパリン及び本発明物質の濃度変化によるAPTT及びTTの変化を示す図である。図中、縦軸は凝固時間 (秒)、横軸は最終濃度 (μg/ml) を示す。

【図5】図5は不飽和二糖標準品 (a)、標準ヘパリン (b)、及び本発明物質 (c) の二糖体分析におけるHPLCによる溶出チャート図である。

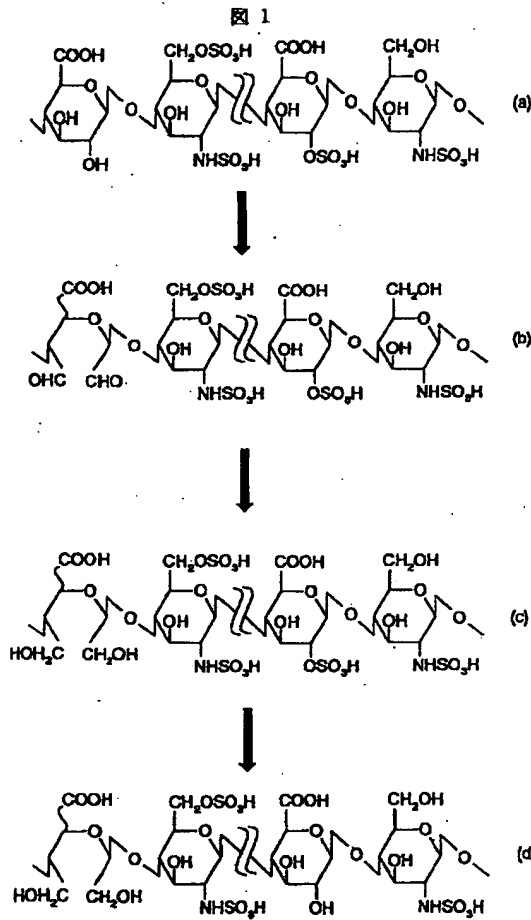
【図6】図6は本発明物質の神経細胞死抑制活性への影響を示す図である。図中、縦軸は救済された細胞割合

23

(%)、横軸は最終濃度 ($\mu\text{g/ml}$) を示す。

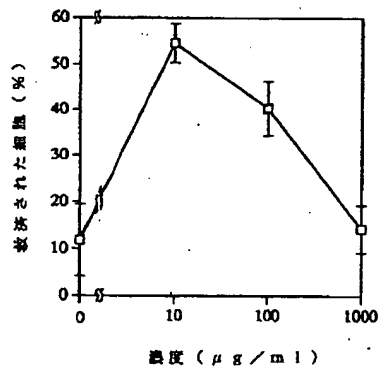
【図 7】 図 7 は標準ヘパリン及び本発明物質のシアリダーゼ活性への影響を示す図である。図中、縦軸はシアリダーゼ活性 (%) を表す。

【図 1】



【図 6】

図 6

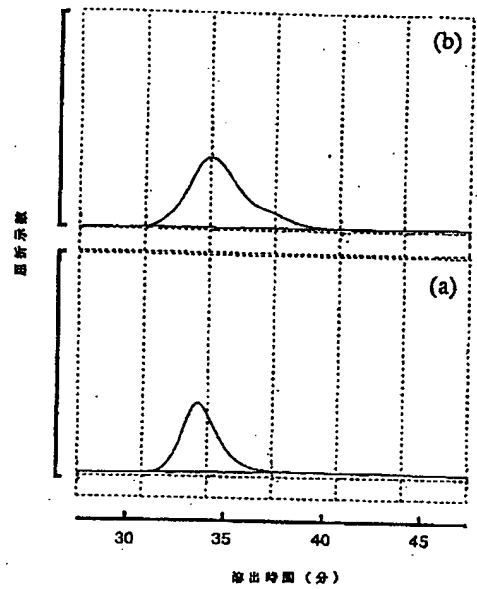


24

【図 8】 図 8 は本発明物質及び NeuAc2en の濃度変化によるシアリダーゼ活性への影響を示す図である。図中、縦軸はシアリダーゼ活性 (%)、横軸は溶液濃度 ($\mu\text{g/ml}$) を示す。

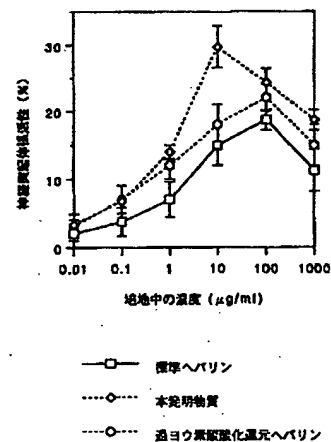
【図 2】

図 2



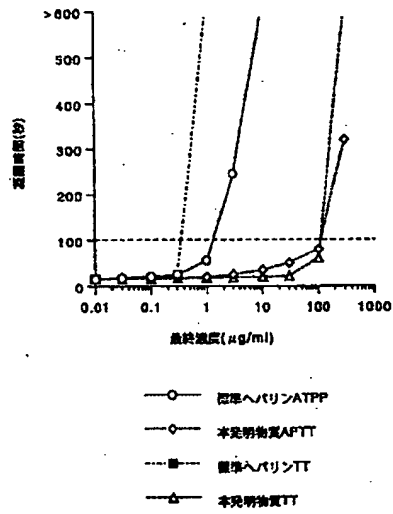
【図 3】

図 3



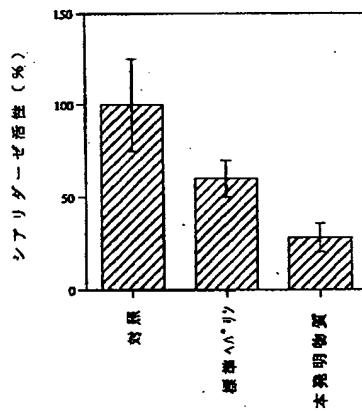
【図 4】

図 4



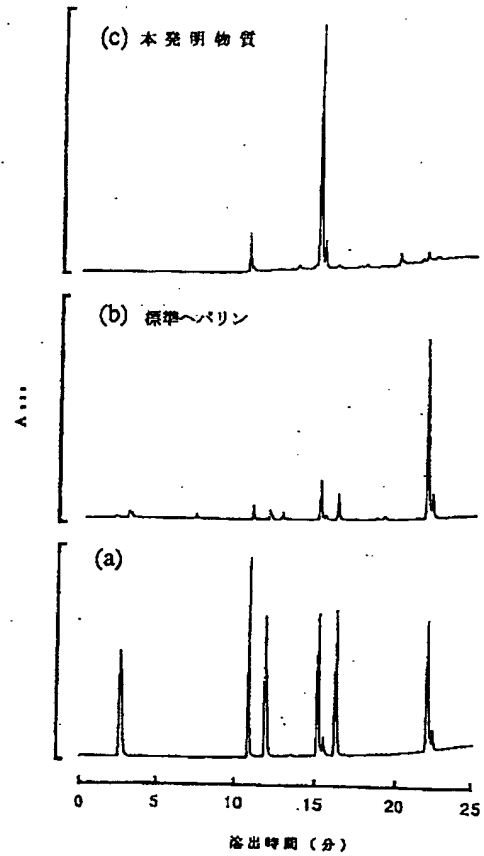
【図 7】

図 7



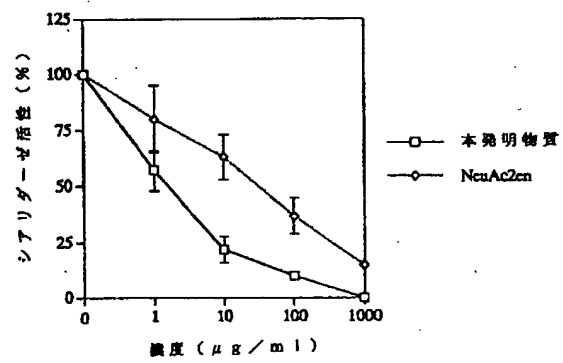
【図 5】

図 5



【図 8】

図 8



フロントページ

(51) Int. Cl. ⁶

C 0 8 B 37/10

識別記号

F I

C 0 8 B 37/10

THIS PAGE BLANK (USP 10)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USP 10)